506.39084X00

#### IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): KINO, ET AL.

Serial No.:

Filed:

September 19, 2000

Title:

FOR PRODUCING AMINO ACIDS BY METHOD

FERMENTATION

Group:

### LETTER CLAIMING RIGHT OF PRIORITY

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks Washington, D.C. 20231

September 19, 2000

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55, the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on Japanese Patent Application No.(s) 11-265108 filed September 20, 1999.

A certified copy of said Japanese Application is attached.

Respectfully submitted,

ANTONELLI, TERRY, STOUT & KRAUS, LLP

William I. Solomon

Registration No. 28,565

WIS/mdt Attachment (703)312 6600



# 日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 Date of Application:

1999年 9月20日

出 願 番 号 Application Number:

平成11年特許願第265108号

協和醗酵工業株式会社

2000年 4月28日

特許庁長官 Commissioner, Patent Office

近藤隆彦

#### 特平11-265108

【書類名】

【整理番号】 H11-1182T4

【提出日】 平成11年 9月20日

特許願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/04

【発明者】

【住所又は居所】 千葉市花見川区瑞穂1-14-8

【氏名】 木野 邦器

【発明者】

【住所又は居所】 山口県防府市協和町1番1号協和醗酵工業株式会社 技

術研究所内

【氏名】 阿部 哲也

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

# 【書類名】 明細書

【発明の名称】 発酵法によるアミノ酸の製造法

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 Lーアラニン、Lーバリン、Lーロイシン、Lーイソロイシン、Lーメチオニン、Lーフェニルアラニン、Lープロリン、グリシン、Lーセリン、Lートレオニン、Lーシステイン、Lーチロシン、Lーアスパラギン、Lーグルタミン、Lーリジン、Lーヒスチジン、Lーアルギニン、Lーアスパラギン酸およびLーグルタミン酸からなる群より選ばれるアミノ酸の生産能を有し、かつアミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物を培地に培養し、培養物中に該アミノ酸を生成蓄積させ、該培養物から該アミノ酸を採取することを特徴とする、該アミノ酸の製造法。

【請求項2】 アミノキノリン誘導体が、クロロキン、アモジアキン、ペンタキン、プリマキンおよびこれら物質のアルカリ金属塩からなる群より選ばれるアミノキノリン誘導体である、請求項1記載のアミノ酸の製造法。

【請求項3】 アミノ酸がL-ヒスチジンである、請求項1記載のアミノ酸の製造法。

【請求項4】 微生物がセラチア属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、ミクロバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属からなる群より選ばれる微生物である、請求項1記載のアミノ酸の製造方法。

【請求項5】 微生物がエシェリヒア・コリH-9341(FERM BP-6674)である、請求項4記載のアミノ酸の製造方法。

【請求項6】 Lーアラニン、Lーバリン、Lーロイシン、Lーイソロイシン、Lーメチオニン、Lーフェニルアラニン、Lープロリン、グリシン、Lーセリン、Lートレオニン、Lーシステイン、Lーチロシン、Lーアスパラギン、Lーグルタミン、Lーリジン、Lーヒスチジン、Lーアルギニン、Lーアスパラギン数およびLーグルタミン酸からなる群より選ばれるアミノ酸の生産能を有し、かつアミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物。

【請求項7】 アミノキノリン誘導体が、クロロキン、アモジアキン、ペンタキン、プリマキンおよびこれら物質のアルカリ金属塩からなる群より選ばれる

アミノキノリン誘導体である、請求項6記載の微生物。

【請求項8】 アミノ酸がLーヒスチジンである、請求項6記載の微生物。

【請求項9】 微生物がセラチア属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、ミクロバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属からなる群より選ばれる微生物である、請求項6~8いずれか1項に記載の微生物。

【請求項10】 エシェリヒア・コリH-9341(FERM BP-6674)。

#### 【発明の詳細な説明】

[0001]

【発明の属する技術分野】

本願発明は、発酵法によるアミノ酸の工業的に効率の良い製造法に関する。

[0002]

【従来の技術】

糖から直接L-アミノ酸を生成蓄積させる直接発酵法としては、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、エシェリヒア属、セラチア属、アースロバクター属などの微生物の野生株から誘導した突然変異株を用いる方法が知られている。例えばL-アミノ酸生産性変異株としては、アミノ酸等の栄養要求性を有した菌株(特公昭56-10037)、アミノ酸のアナログやビタミン等の耐性変異を有した菌株(特開昭56-134993、特開昭62-44193)、栄養要求性変異とアミノ酸のアナログ耐性変異を共有した菌株(特開昭50-31093、特開昭56-134993)、分解能の低下した菌株(特開昭63-273487、特公昭52-48195)、あるいはアミノアシルt-RNA合成酵素に基質親和性が減少した変異を有する菌株(特開平4-330275)等が知られている。

[0003]

さらにアミノ酸の生合成に係わる遺伝子を含む組換え体 DNAで形質転換された菌株を用いることで、アミノ酸の生産性を向上することができることが知られている(特開昭 58-893、特開昭 60-12995、特開昭 60-210994、特開昭 60-30693、特開昭 61-195695、特開昭 61-2719

81、特開平2-458、特開平2-42988、特公平1-42676、特公平 5-11960、特公平5-26467)。

[0004]

L-トリプトファンの製造においては、アミノキノリン誘導体またはフェノチアジン誘導体に対する耐性を付与することでアミノ酸生産性を向上させた例が報告されている(特開平4-112795)。

[0005]

【発明が解決しようとする課題】

本願発明の目的は、医薬品、化学品、食品および飼料添加物などとして有用なアミノ酸の工業的に効率のよい製造方法を提供することにある。

[0006]

【課題を解決するための手段】

即ち、本願発明は、以下の(1)~(10)に関する。

- (1) Lーアラニン、Lーバリン、Lーロイシン、Lーイソロイシン、Lーメチオニン、Lーフェニルアラニン、Lープロリン、グリシン、Lーセリン、Lートレオニン、Lーシステイン、Lーチロシン、Lーアスパラギン、Lーグルタミン、Lーリジン、Lーヒスチジン、Lーアルギニン、Lーアスパラギン酸およびLーグルタミン酸からなる群より選ばれるアミノ酸(以下、本願発明にかかわるアミノ酸と略す)の生産能を有し、かつアミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物を培地に培養し、培養物中に該アミノ酸を生成蓄積させ、該培養物から該アミノ酸を採取することを特徴とする、該アミノ酸の製造法。
- (2) アミノキノリン誘導体が、クロロキン、アモジアキン、ペンタキン 、プリマキンおよびこれら物質のアルカリ金属塩からなる群より選ばれるアミノ キノリン誘導体である、上記(1)のアミノ酸の製造法。
  - (3) アミノ酸がL-ヒスチジンである、上記(1)のアミノ酸の製造法

[0007]

(4) 微生物がセラチア属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属 、ミクロバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属からなる群より選ばれる 微生物である、上記(1)のアミノ酸の製造方法。

- (5) 微生物がエシェリヒア・コリH-9341(FERM BP-6674)である、上記(4)のアミノ酸の製造方法。
- (6) 本願発明にかかわるアミノ酸の生産能を有し、かつアミノキノリン 誘導体に対する耐性を有する微生物。
- (7) アミノキノリン誘導体が、クロロキン、アモジアキン、ペンタキン、プリマキンおよびこれら物質のアルカリ金属塩からなる群より選ばれるアミノキノリン誘導体である、上記(6)の微生物。
  - (8) アミノ酸がL-ヒスチジンである、上記(6)の微生物。
- (9) 微生物がセラチア属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、ミクロバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属からなる群より選ばれる 微生物である、上記(6)~(8)いずれか1つに記載の微生物。
  - (10) エシェリヒア・コリH-9341(FERM BP-6674)。 【0008】

# 【発明の実施の形態】

本願発明にかかわるアミノ酸の生産菌(以下、本願発明の微生物という)としては、本願発明にかかわるアミノ酸の生産能を有し、かつアミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物であればいずれも用いることができる。該微生物としては、例えば、セラチア属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、ミクロバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属に属する微生物、例えばSerratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marces cens、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopo ietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfu reus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globifo rmis、Microbacterium ammoniaphilum、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliq uefacines、Escherichia coli等をあげることができる。

[0009]

本願発明に用いられるアミノキノリン誘導体は、アミノキノリン骨格を有する

物質であればいずれでも用いられる。例えば、クロロキン(chloroquine)、アモジアキン(amodiaquine)などの4~アミノキノリン誘導体や、ペンタキン(pentaquine)、プリマキン(primaquine)などの8~アミノキノリン誘導体などが用いられる。また、これら物質のアルカリ金属塩などの塩も用いられる。これら物質は、いずれも抗マラリア薬(antimalarial drugs)として知られている。ここで、アルカリ金属はナトリウム、カリウム等のアルカリ金属であればいずれでも用いられる。

## [0010]

本願発明の微生物は、本願発明にかかわるアミノ酸を生産する能力を有する微生物に紫外線照射やNーメチルーN'ーニトローNーニトロソグアニジン(NTG)などの突然変異誘発剤による通常の変異処理を施し、該変異株を親株が生育できないか、または生育が不良となる濃度のアミノキノリン誘導体を含む寒天平板培地上で通常の条件下で培養し、生じたコロニーのうちで親株よりも生育が速いか大きなコロニーを生ずる株を選択することにより、アミノキノリン誘導体に対する耐性の付与された株として取得することができる。

### [0011]

上記のアミノ酸生産能を有する微生物として、本願発明にかかわるアミノ酸の生産能を有する微生物を用いても良いし、また、公知の方法により新たに野生型株から取得しても良い。公知の方法としては、上記の変異処理法の他に、細胞融合法、形質導入法、その他の遺伝子組換え技法[いずれもMolecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)]等をあげることができる。

#### [0012]

また、本願発明の微生物は、アミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物を通常の変異処理法を用いて取得した後、該微生物に本願発明にかかわるアミノ酸生産能を上記方法により付与することによっても取得することができる。

本願発明の微生物として、具体的にはエシェリヒア・コリH-9341 (FE RM BP-6674) をあげることができる。

# [0013]

本願発明の微生物を用いた本願発明にかかわるアミノ酸の生産は、通常の細菌培養法にて実施することができる。

本願発明にかかわるアミノ酸の生産に用いる培地としては、炭素源、窒素源、 無機物、その他使用菌株の必要とする微量の栄養素を程よく含有するものならば 、合成培地または天然培地いずれも使用可能である。

#### [0014]

炭素源としては、グルコース、フラクトース、ラクトース、糖蜜、セルロース 加水分解物、粗糖加水分解物、澱粉加水分解物などの炭水化物、ピルビン酸、酢 酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸などの有機酸、グリセリン、エタノールなどのア ルコールなどが用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの各種無機塩類、有機酸のアンモニウム塩、アミン類、ペプトン、肉エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物などが用いられる。

# [0015]

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、塩化カルシウム、炭酸カルシウムなどが用いられる。

培養は、振盪培養または通気撹拌培養などの好気的条件下にて行われ、培養温度は20~40℃で、好ましくは28~37℃の範囲である。培地のpHはpH 5~9の範囲で、好ましくは中性付近に保持する。培地のpH調整は炭酸カルシウム、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、アンモニア、pH緩衝液などによって行う。通常1~7日間の培養により、培養液中に本願発明にかかわるアミノ酸が生成蓄積する。

#### [0016]

培養終了後、培養液から菌体などの沈殿物を除去し、イオン交換処理法、濃縮 法、塩析法などを併用することにより、培養液から該アミノ酸を回収することが できる。 本願発明により得られるアミノ酸としては先にあげた本願発明にかかわるアミノ酸であれば特に限定されないが、例えばL-ヒスチジンをあげることができる

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0017]

#### 【実施例】

実施例1 アミノキノリン誘導体に対する耐性を有するL-ヒスチジン生産性変 異株の取得

ブタペスト条約に基いて平成11年 3月9日付けで、FERM BP-6673 として工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目 1番3号)に寄託されている、メチオニン要求性のエシェリヒア・コリATCC 21318より誘導した1,2,4ートリアゾールアラニンに対する耐性を有するLーヒスチジン生産性変異株H-9340に、常法に従って、N-メチルーN′ーニトローNーニトロソグアニジン(NTG)による変異処理(0.2mg/m1、30℃、30分間)を施した後、プリマキンニナトリウム塩を150mg/L含む寒天平板培地〔グルコース 0.2%、リン酸ーカリウム 0.3%、リン酸ニナトリウム 0.6%、硫酸マグネシウム 0.01%、塩化ナトリウム 0.05%、塩化アンモニウム 0.1%、栄養要求物質(DLーメチオニン)50mg/L、寒天 1.5%、pH7.2〕に塗布した。

[0018]

菌体を塗布した上記寒天平板培地を30℃で2~6日間培養し、生育してきた大きなコロニーを釣菌分離し、H-9341を取得した。この菌株はブタペスト条約に基いて平成11年3月9日付けで、FERM BP-6674 として工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。

実施例2 プリマキンを含む寒天平板培地での生育比較試験

実施例1で取得した変異株H-9341のプリマキン含有寒天平板培地での生育を親株H-9340と比較した。

[0019]

それぞれの変異株を取得した時と同濃度のプリマキン二ナトリウム塩を含む上記寒天平板培地上に、天然培地で 24 時間培養した各菌体を生理食塩水に懸濁して  $1\sim10$  c e 11 s / c m  $^2$  になるように塗布し、 33  $\mathbb{C}$  、 4 日間培養した。

該培養による生育の可否を第1表に示した。

親株であるH-9340は、プリマキンを含む寒天培地上では生育できなかった。

[0020]

【表1】

第1表

	寒天培地添加物		
菌株	無添加	プリマキンNa塩	
H-9340	+	_	
H-9341	+	+	

[0021]

実施例3 L-ヒスチジンの製造

実施例1で取得した変異株H-9341または親株H-9340を用いたL-ヒスチジンの製造を以下の方法で行った。

H-9340とH-9341を、それぞれ太型試験管中の種培地(グルコース2%、糖蜜0.5%、コーンスチープリカー1%、硫安1.2%、リン酸ーカリウム0.3%、硫酸マグネシウム0.015%、DL-メチオニン600mg/L、アデニン100mg/L、炭酸カルシウム3%、pH6.2)6mlに接種して、30℃で12時間振盪培養した。

[0022]

得られた種培養液 0. 1 m l を、それぞれ太型試験管中の生産培地(グルコース 6%、コーンスチープリカー 1%、硫酸アンモニウム 2. 4%、リン酸ーカリウム 0. 4%、硫酸マグネシウム 0. 015%、チアミン塩酸塩 10 m g/L、パントテン酸カルシウム 10 m g/L、炭酸カルシウム 3%、p H 6

. 5) 5 m 1 に接種して、30℃で48時間振盪培養した。

[0023]

培養後、培養液中のL-ヒスチジンの蓄積量を、高速液体クロマトグラフィー 法により定量した。

結果を第2表に示した。

親株H-9340に比べ変異株H-9341のL-ヒスチジン生産性は向上していた。

[0024]

# 【表2】

#### 第2表

菌株	Lーヒスチジン(g/l)	
H-9340	13. 0	
H-9341	14. 2	

[0025]

#### 【発明の効果】

本願発明により、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、グリシン、L-セリン、L-トレオニン、L-システイン、L-チロシン、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-リジン、L-ヒスチジン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸およびL-グルタミン酸からなる群より選ばれるアミノ酸(以下、本願発明にかかわるアミノ酸と略す)の生産能を有し、かつアミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物を取得し、培地で培養することで、本願発明にかかわるアミノ酸の生産性を向上させることができ、本願発明にかかわるアミノ酸を工業的に効率よく、かつ安価に製造することができる。

# 【書類名】 要約書

# 【要約】

【課題】 医薬品、化学品、食品および飼料用添加物などとして有用なL-アラニン、Lーバリン、Lーロイシン、Lーイソロイシン、Lーメチオニン、Lーフェニルアラニン、Lープロリン、グリシン、Lーセリン、Lートレオニン、Lーシステイン、Lーチロシン、Lーアスパラギン、Lーグルタミン、Lーリジン、Lーヒスチジン、Lーアルギニン、Lーアスパラギン酸およびLーグルタミン酸からなる群より選ばれるアミノ酸(以下、本願発明にかかわるアミノ酸と略す)の工業的に効率のよい製造法を提供する。

【解決手段】 本願発明にかかわるアミノ酸の生産能を有し、アミノキノリン誘導体に耐性を有する微生物を培地に培養し、該微生物培養物中に本願発明にかかわるアミノ酸を生成蓄積させ、該培養物から該アミノ酸を採取する。

【選択図】 なし

【書類名】

手続補足書

【提出日】

平成11年 9月21日

【あて先】

特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】

平成11年特許願第265108号

【補足をする者】

【識別番号】

000001029

【氏名又は名称】

協和醗酵工業株式会社

【代表者】

平田 正

【補足対象書類名】

特許願

【補足の内容】

原寄託についての受託証(写)を提出する。

【提出物件の目録】

【物件名】

原寄託についての受託証 (写)

2

国等様式

INTERNATIONAL FORM



29918000089

| 特許手続上の優生物の新酢の国際的承認 | に関するプタバスト条約 |

下記国際客託当局によって規則?. 1に従い 発行される。

原寄託についての受託証

BUDATEST TREATY ON THE INTERNALIONAL RECOCNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RBOSIPO IN OUR CASE OF AN ORIGINAL DBPOSIT

.ssued pursuant to kure 7.1 by the LN.ERNATIONAL OBPOSITARY AUTHORITY , centilied at the bectom of this pape.

氏名 (名称)

**班和醗酵】業株式会社** 

取締役社長 平田 工

常託者

表で名 7

股

東京都千代田区大手町一丁目6番1号

<u>. 微生物の表示</u>	
(資配省が付した識別のための表示) Escherichia coli H-9340	(受託音号) FERM BF- 6673
科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の爆生物には、次の準順を記載した文書が迭付されていた。	
□ 科学的任質 ■ 分類学出心包包	
3. 受領及び受託	*
本国際資料当局は、 年成 1 日 年 3 月 9 日 (原書記目) に       4 移管路次の受望       本開幕資料当局は、 年 月 日 (原書記目) に       そして、 年 月 日 に原書記よりブダベスト会員	· 胸心污染 6. 6. 6. 5. 7 ·
5. 国際本計本局	FOUNDATION OF MAIL WATER BLANCE OF BY DIVIS
海商産業省工業技術院生命「学工業 National LETTER Bicociones 名称: Acon Sall Letter Company 内では、2015年 1970年 19	and Human-Technology
- あて名: 日本国家城県つく株活施177日 (1977年) - あて名: 日本国家城県つく株活施177日 (1977年)	5-85661
1−3. Higosbi i chome Tsukuba-sbi 305-856	Ibaraki sen 4. japan
	学成11年(1999) 3月 9日

国際朱式

INTERNATIONAL FORM

V

特許手続上の後生物の各託の国際的承認 に関するプタベスト条約

「下記国際寺託当局によって規則7、!に従い 発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROGREANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN OXICINAL DEFOSIO

issued pursuant to Rule 7. "by the INCERNATIONAL DEPOSITIONAL ACTIONITY identified at the barrow of this page.

氏名(名称)

協和脫釋工業株式会社

取締役社長 平田 正

要託者

あて名。エ

贬

東京都子代田区大手町・丁目も巻1号

微生物の表示	
(客託者が付した観別のための表示)	(受託番号)
Escherich a coli H-9341	FERM BP- 6671
24学的性質及び分類学上の位置	
1 構の微圧物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
① 科学的信仰	
■ 分類字上の位置	
、支領及び受託	
- A THINK Y ALE	
本国際電託当局は、 学成 11 年   3 月   9 円 (原寄馳目) [	(受領した工機の微生物を受託する。
教育請求の受質	
- 李回原谷託当局は、	
	ドランに基立し、新方に、NVの開始がまったPR こんの
,巨際奇話出路	
透商商業省工業技術院生命工学工業	<b>( 持術研究所</b>
ASIM MY HILL AND	(3× 8) 6(7¢//)
	and Human-Technology
A A : Azen (E 4 5 cie) Sciel	ice and Technology
Dr. Sh. LZen Ully hi Director	r-General
あで名: 日本国法域県つく校匠変化型自立等等等(郵便書号30 1-3. Hightai I. caome Taykush-aaa	
	Tonraki-kan sa: :AZAB
	平成11年(1999) 3月 9日

-,

# 認定 • 付加情報

特許出願の番号

平成11年 特許願 第265108号

受付番号

29918000089

書類名

手続補足書

担当官

小菅 博 2143

作成日

平成11年11月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 原寄託についての受託証(写) 1



# 出願人履歴情報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社